

# Pat nt Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 06239885  
PUBLICATION DATE : 30-08-94

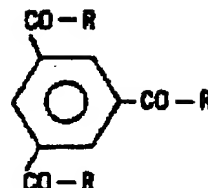
APPLICATION DATE : 19-02-93  
APPLICATION NUMBER : 05030794

APPLICANT : FUJI PHOTO FILM CO LTD;

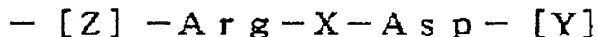
INVENTOR : AZUMA ICHIRO;

INT.CL. : C07K 5/10 A61K 37/02 C07K 5/08  
C07K 7/06 // C07K 99:00

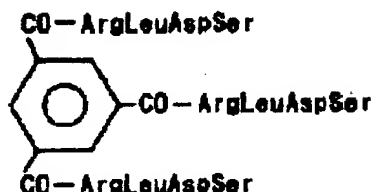
TITLE : PEPTIDE DERIVATIVE AND ITS USE



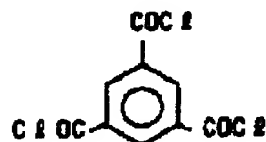
I



II



III



IV

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain a new compound having sufficiently high cell-adhesion protein-like activity, containing a peptide sequence having excellent cancer metastasis-suppressing action compared with the pore sequence of fibronectin, having high stability in blood and useful as a cancer metastasis suppressing agent.

CONSTITUTION: The compound of formula I [R is peptide sequence of formula II (Arg is L- or D-arginine; Asp is L- or D-aspartic acid; X is L- or D-leucine or D-isoleucine; Z is none or Asp; Y is none or L-serine or L-threonine)] or its salt, e.g. the compound of formula III. This compound is produced by successively condensing protected amino acids by solid phase process or liquid phase process until the total protected peptide fragment is synthesized, removing the amino-terminal protecting group of the protected peptide, reacting the product with trimesoyl chloride in the presence of a dehydrohalogenation agent such as pyridine and deprotecting the reactional product.

COPYRIGHT: (C)1994,JPO&Japio

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-239885

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 8 月 30 日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 5/10		8318-4H		
A 6 1 K 37/02	A D U	8314-4C		
C 0 7 K 5/08		8318-4H		
7/06	Z N A Z	8318-4H		
// C 0 7 K 99:00				

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平5-30794

(22) 出願日 平成 5 年 (1993) 2 月 19 日

(71) 出願人 000005201

富士写真フイルム株式会社  
神奈川県南足柄市中沼210番地

(72) 発明者 森 英登

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真  
フイルム株式会社内

(72) 発明者 小島 政芳

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真  
フイルム株式会社内

(72) 発明者 駒澤 宏幸

神奈川県南足柄市中沼210番地 富士写真  
フイルム株式会社内

(74) 代理人 弁理士 中村 稔 (外 6 名)

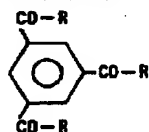
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド誘導体及びその用途

(57) 【要約】 (修正有)

【目的】 細胞接着性蛋白質様の活性を保持しており、Arg-Gly-Aspよりもガン転移抑制能が増強されたペプチド配列を必須構成単位として含み、さらに血液中的の安定性が高く、簡便な手段で合成可能なペプチド誘導体を提供する。

【構成】 式 (I) で表されるペプチド誘導体またはその薬理学的に許容できる塩及びそれを有効成分として含有するガン転移抑制剤。



(I)

を表し、存在する場合 Z は L-または D-アスパラギン酸を、Y は L-セリンまたは L-スレオニを表す。))

〔R は下記式 (II) で表されるペプチド配列を表す。〕

- [Z] - Arg - X - Asp - [Y] (II)

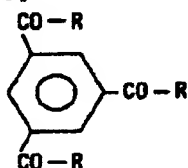
(Arg は L-または D-アルギニンを表し、Asp は L-または D-アスパラギン酸を表す。X は L-または D-ロイシンもしくは D-イソロイシンを表す。[ ]

は [ ] 内の残基が存在しても存在しなくてもよいこと

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式 (I) で表されるペプチド誘導体またはその薬理学的に許容できる塩。一般式 (I)

【化1】



(I)

\*10

- [Z] - Arg - X - Asp - [Y]

一般式 (II) 中、Arg は L- または D- アルギニンを表し、Asp は L- または D- アスパラギン酸を表す。X は L- または D- ロイシンもしくは D- イソロイシンを表す。[ ] は、[ ] 内の残基が存在しても存在しなくてもよいことを表し、存在する場合 Z は L- または D- アスパラギン酸を、Y は L- セリンまたは L- スレオニンを表す。

【請求項2】 薬学上許容できる賦形剤及び請求項1に記載のペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を有効成分として含有してなる、ガン転移抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は特定の構成を有するペプチドの誘導体またはその薬学上許容可能な塩及びそれらの用途に関するものである。

【0002】

【従来技術】 フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチン等は細胞と結合組織との結合に関与し、また動物細胞の細胞機能に関連した種々の生物活性を有する蛋白質であり、細胞接着性蛋白質と総称される。例えばフィブロネクチンは肝臓で生成され、ヒト血漿中に約0.3 mg/mlの濃度で存在する糖蛋白質である。

【0003】 フィブロネクチンはその1次構造が分子クローニングを用いて決定されており (Koornblit, A. R. et al., EMBO Journal, 4巻, 2519 (1985))、分子量約250KのポリペプチドであるA鎖と約240KのB鎖がC末端付近でジスルフィド結合した2量体蛋白質であることが明らかにされている。またラミニンについても佐々木ら (Sasaki, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81巻, 935 (1987), Sasaki, M. et al., J. Biol. Chem., 262巻, 17111 (1987)) によりその1次構造が決定されている。ラミニンはA、B1、B2とよばれる3本のポリペプチド鎖から構成されており、十字架状の構造をとっていることが知られている。

【0004】 そして細胞接着性に関与する結合部位の研究も行われ、フィブロネクチンの細胞接着部のコア配列はArg-Gly-Asp (RGD) なるトリペプチドであることが1984年に報告された (Pierschbacher, M. D. et al., Nature 309巻, 30 (1984))。またラミニン

\*一般式 (I) 中、Rは下記一般式 (II) で表されるペプチド配列を表す。一般式 (II)

(II)

の細胞接着部位のコア配列はTyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR) で表されるペプチドであることも解明されている (Graf, J. et al., Cell 148巻, 989 (1987))。

【0005】 これらフィブロネクチンやラミニンは、上記コア配列を介して細胞のレセプターと結合することにより各種の情報を細胞に伝達し、またヘパリン、コラーゲン、フィブリン等の生体高分子とも結合して細胞と結合組織との接着、細胞の分化、増殖に関与しているものと考えられている。

【0006】 このように細胞接着性蛋白質は多様な生物活性を有するため、その活性部位配列ペプチドを用いた研究が精力的になされている。例えばフィブロネクチンの細胞結合部のコア配列の利用としては、ポリマーにRGD配列を有するペプチドを共有結合させ、人工臓器用基体や動物細胞培養用基体として用いる方法 (特開平1-309682号公報、特開平1-305960号公報、W0 90/05036 A 特許)、RGD配列を有するペプチドに疎水性領域を連結することにより目的とするペプチドを固体表面に付着させ、歯科用埋め込み剤や組織培養基体を利用する方法 (W0 90/11297A 特許)、RGD配列を有する種々の環状及び鎖状オリゴペプチドまたはその類似体を用いて血小板凝集を阻害する方法あるいは血栓症を予防、治療する方法 (高分子学会予稿集第38巻, 3149 (1989)、特開平2-174797号公報、特開平3-118330号公報、特開平3-118331号公報、特開平3-118398号公報、特開平3-118397号公報、特開平3-118333号公報、W0 91/01331 特許、W0 91/07429 特許、W0 91/15515 特許、W0 92/00995 特許)、RGDペプチドとヒアルロン酸を共有結合した化合物を用いて血小板凝集を調節する方法 (特開平4-134096号公報)、RGD配列を有するペプチドを細胞移動制御剤として用いる方法 (特開平2-4716号公報)、RGD配列を有するペプチドを固定化した膜を細胞接着膜として用いる方法 (高分子学会予稿集第37巻, 705 (1988))、RGDS配列を有するポリペプチドを体外血液用血小板保護剤として用いる方法 (特開昭64-6217号公報)、ポリペプチド分子内に細胞接着活性を有するペプチドを付加することにより人工機能性ポリペプチドとして利用する方法 (特開平3-34996号公報) 等が開示されている。

【0007】更に近年、細胞接着性蛋白質はガン転移に関与する生体分子としても注目されてきている。癌転移の一連の段階では、ガン細胞は種々の宿主細胞や生体高分子と接触する。このときフィブロネクチンやラミニンのような細胞接着性分子が存在すると該細胞は多細胞塊を形成し、ガン細胞の増殖や生存がより容易になる。ところが、たとえばフィブロネクチンの接着部位コア配列であるトリペプチドRGDが共存すると、競争的に癌細胞上のフィブロネクチンレセプターと結合するため細胞接着がブロックされ、ガン転移阻害作用を示すことが報告されている (Science 238巻, 467 (1986))。

【0008】しかしながらRGDペプチドはそれ単独では細胞接着活性が充分でないため、効果の増強をはかる目的で該配列を有するオリゴペプチド、環状オリゴペプチド、あるいはその繰返し配列を有するポリペプチドを用いてガン転移を制御する方法 (Int. J. Biol. Macromol., 11巻, 23 (1989)、同誌, 11巻, 226 (1989)、Jpn. J. Cancer Res., 60巻, 722, (1989)、特開平2-174798号公報)、あるいは腫瘍再発を防止する方法 (特開平2-240020号公報) が試みられている。またフィブロネクチン分子中の細胞接着ポリペプチドとヘパリン結合ポリペプチドを構成単位とするポリペプチドを用いてガン転移を抑制する方法 (特開平3-127742号公報) も報告されている。しかし従来の研究では、RGD (Arg-Gly-Asp) なるコア配列はレセプターとリガンドの認識に関与する各種の生物活性の発現に必須なものとされており、特にGly部分を他のアミノ酸残基で置換したアナログでは、活性が消失することが報告されていた (高分子学会予稿集, 38巻, 3149 (1989)、J. Biol. Chem., 262巻, 17294 (1987))。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】上述のように、フィブロネクチン等の細胞接着性蛋白質あるいはそのペプチド断片を医薬品や関連医用材料として利用する研究は盛んに行われており、特にRGDペプチドをガン転移抑制剤として応用しようとする試みは活発である。しかしながら該コア配列の細胞接着活性は未だ充分でないため、それらのガン転移抑制作用は実際の医療に応用するためには満足できるものではなかった。また一般に薬物が生体に投与されたのち薬効を維持するためには、それ自体の生物活性の強さのみならず薬物の生体内での安定性 (例えば血流中での滞留時間や排泄される時間など) が重要であることが知られている。細胞接着性蛋白質の活性部\*

- [Z] - Arg - X - Asp - [Y]

一般式 (II) 中、ArgはL-またはD-アルギニンを表し、AspはL-またはD-アスパラギン酸を表す。XはL-またはD-ロイシンもしくはD-イソロイシンを表す。[ ] は、[ ] 内の残基が存在しても存在しなくてもよいことを表し、存在する場合ZはL-またはD-アスパラギン酸を、YはL-セリンまたはL-スレ

\*位コア配列ペプチドも例外ではなく、それ単独ではペプチド類に特有の速い代謝分解や排泄が起こり、結果的に所望の効果が期待できない場合も生ずる。そこで生体内での安定性を向上させるため従来技術の項で説明したような種々の方法が報告されているが、それらの化合物のなかには未だ生物活性が不充分であったり、合成が困難なものも多い。またポリエチレングリコール (PEG) 等の高分子と該コア配列を連結する方法や、該コア配列を繰返すことにより高分子量化を行う方法も知られているが、これらの方法では目的物の構造や分子量を特定して合成を行うことは極めて困難であり、この点で更に有効な物質の開発が必要とされていた。

【0010】従って本発明の目的は、細胞接着性蛋白質様の活性を充分に保持しており、接着コア配列であるArg-Gly-Aspよりもガン転移抑制能が増強された新規なペプチド配列を必須構成単位として含み、さらに血液中での安定性が高く、簡便な手段で合成可能な新規なペプチド誘導体を提供することにある。本発明はさらに上記ペプチド誘導体を含有してなる薬物組成物の提供も目的とする。

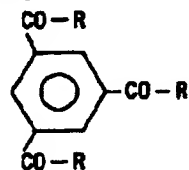
【0011】

【課題を解決する手段】本発明者らはこれまでにフィブロネクチンの接着コア配列Arg-Gly-Asp-Serの特にGly部とSer部、およびN末端側を種々のアミノ酸に変更したアナログの系統的な検討を行った結果、ガン転移抑制活性を充分に保持し、血液中での安定性の高い新規なペプチド配列を見出し、すでに特許出願済 (特願平4-22799) である。本発明者らは、さらに合成も容易でかつガン転移抑制能の高い新規な化合物を求めて鋭意検討を行った結果、下記一般式 (I) で表されるペプチド誘導体またはその薬学上許容できる塩を見出したことにより上記課題を達成、本発明を完成したものである。一般式

(I)

【0012】

【化2】



(I)

【0013】一般式 (I) 中、Rは下記一般式 (II) で表されるペプチド配列を表す。一般式 (II)

(II)

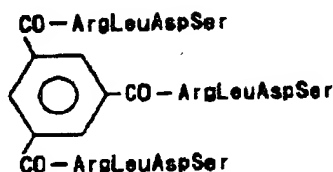
オニンを表す。

【0014】本発明のペプチド誘導体は、一般式 (II) で表されるペプチドのN末端アミノ基がトリメチン酸とアミド結合してなる化合物であり、1分子中に3個の一般式 (II) で表されるペプチド配列を含んでいることを特徴とする。従っていわゆるポリマー類とは異なり、分

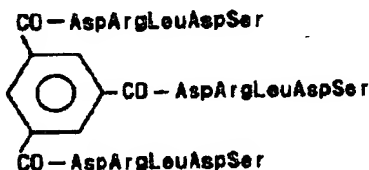
子構造は明確である。本発明において、一般式 (II) で表されるペプチド配列をトリメシン酸と共有結合せしめるのは、有効なペプチドの周辺を修飾することにより生体内酵素等による分解から保護したり、また高分子量にして徐放効果を付与することを意図したものである。

【0015】本発明のペプチド誘導体中に存在するイオン性基は、適当な対イオンと塩を形成していてもよい。塩の状態でも本発明の化合物はその生物学的活性を十分に維持する。ただしその塩は生理学的、薬理的に許容されるものであることが必要である。具体的には塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩の様な無機酸との塩、酢酸塩、乳酸塩、酒石酸塩等の有機酸との塩、さらにナト\*

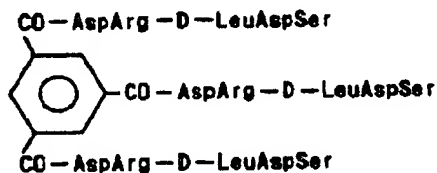
#### 化合物 1



#### 化合物 2



#### 化合物 3



【0018】次に本発明の化合物の合成法について説明する。本発明のペプチド誘導体は種々の方法でこれ合成することができるが、まず保護ペプチド部を合成のちアミノ末端側の保護基を除去し、これをトリメシン酸と縮合せしめ、しかるのちに保護基を除去することにより合成する方法が実用的かつ有利である。ペプチド部の

\*リウム塩、カリウム塩などが挙げられるが、なかでも塩酸塩、ナトリウム塩が特に好ましい。そのような塩への変換は慣用手段により行うことができる。

【0016】以下に本発明のペプチド誘導体の具体例を列挙するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお該ペプチド誘導体のC末端が-OHの場合は、該分野の慣例によりその記載を省略する。またアミノ酸残基がD-体の場合はD- と表記するが、天然型のL-体の場合は特に表記していない。

【0017】

【化3】

合成方法としては特に限定しないが、固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法がまず挙げられる。固相法及び固相法を利用したペプチド自動合成装置による合成法に関しては、生化学実験講座・タンパク質の化学IV p.207 (日本生化学会編、東京化学同人)、続生化学実験講座・タンパク質の化学 (下) p.6

41 (日本生化学会編、東京化学同人) 等に記載されている。

【0019】本発明の化合物のペプチド部は液相法によって合成する場合は、C末端成分となる保護アミノ酸から出発し、C末端を保護あるいは修飾ののちアミノ末端保護基を除去、以下保護アミノ酸残基を逐次縮合あるいはフラグメント縮合を行い、まず全保護ペプチドを合成する。保護アミノ酸あるいは保護ペプチドを縮合する方法としては、公知の方法、例えば泉屋信夫ら編「ペプチド合成の基礎と実験」(丸善)に記載の方法のなかから適宜選択することができるが、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールとDCCを用いるDCC-Additive法、あるいはカルボニルジイミダゾールを用いる縮合法が最も良い結果を与えた。

【0020】以上の方法により合成した全保護ペプチドのアミノ末端保護基を除去し、これをトリメシン酸と縮合する。縮合反応を行う方法としては、DCCあるいはカルボニルジイミダゾールといった縮合剤を用いることも可能であるが、ビリジンあるいは3級アミン等の脱ハロゲン化水素剤の存在下、酸ハロゲン化物具体的にはトリメシン酸クロライドと反応させる方法が実用的かつ有利である。トリメシン酸クロライドは市販品を用いることも勿論可能である。

【0021】保護基の除去の条件は用いている保護基の種類に依存する。通常用いられる方法は、加水素分解、HF処理、トリフルオロメタンスルホン酸/チオアニソール/ $\eta$ -クレゾール/トリフルオロ酢酸混合系処理等であるが、保護基の種類によってはさらにさまざまな方法も可能であることは言うまでもない。目的とするペプチド誘導体は脱保護ののち公知の方法、例えばイオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどで精製することができる。

【0022】つぎに本発明のペプチド誘導体の作用及び用途について説明する。本発明のペプチド誘導体のin vivo系での強力なガン転移抑制作用の機構は未だ完全に明らかではないが、フィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Aspと類似の機構で悪性細胞上のフィブロネクチン受容体に作用し、フィブロネクチンへの結合を阻害することにより悪性細胞の接着、コロニー化、破壊的浸食を阻止するものと考えられる。さらに本発明のペプチド誘導体は1分子中に一般式(II)で表される配列を3個有するため悪性細胞上のフィブロネクチン受容体に多点で作用し、またある程度の大きい分子量を有するため酵素分解や代謝によって排泄されにくく、そのため顕著なガン転移阻害活性を示すと考えられる。本発明のペプチド誘導体は乳癌、表皮癌、筋線メラノーマ(muscle line melanoma)、表皮線神経芽細胞腫xグリオマ(epidermal line neuroblastoma x glioma)、軟骨細胞、フィブロザルコーマを含め種々の細胞の接着及び転移を阻止するのに有効である。

【0023】さらに本発明のペプチド誘導体は創傷治癒作用等の広範な生物活性が認められた。また本発明のペプチド誘導体はマウスを用いて毒性試験を行ったところ、毒性は全く認められなかった。

【0024】本発明のペプチド誘導体またはその薬学上許容可能な塩は、ペプチド系医薬に一般に使用されている投与方法によって使用することができ、通常賦形剤を含む薬物組成物として投与される。この薬物組成物はレミントンの薬科学(Remington's Pharmaceutical Sciences, Merck, 16, (1980))に開示されているように、知られているどのような方法で製造してもよい。賦形剤としては蒸留水、生理食塩水、リン酸塩あるいは酢酸塩の様な緩衝塩類を含有する緩衝液、浸透圧調節剤としての塩化ナトリウムやショ糖、若しくはアスコルビン酸のような酸化防止剤、または許容し得るこれらの組合せがある。

【0025】このような薬物組成物は溶液、錠剤の様な種々の形態とすることができる。投与形態としては経口、経鼻、非経口(静脈注射、皮下注射、腹腔内投与など)等のなかから適宜選択することができる。例えば生理食塩水に溶解して注射用製剤としても良く、あるいは0.1規定程度の酢酸緩衝液に溶解したのち凍結乾燥剤としても良い。またリポソーム中に内包したマイクロカプセル剤あるいはミクロスフェア等の形態で利用することも可能である。

【0026】本発明のペプチド誘導体の投与量は、患者の体重に対して通常一日0.2  $\mu$ g/kgから200 mg/kgの範囲であるが、患者の年齢、体重、症状、投与方法によって決定されるものである。

【0027】

【実施例】以下実施例によって本発明を更に詳細に説明する。なお通常用いられる溶媒や試薬、保護基の表記には以下の略号を使用した。

【0028】Boc : t-ブトキシカルボニル  
Bn : ベンジル  
AcOEt : 酢酸エチル  
Mts : メシチレンスルホニル  
HOBT : 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール  
DCC : ジシクロヘキシルカルボジイミド  
IPr<sub>2</sub>NEt : ジイソプロピルエチルアミン  
DMF : ジメチルホルムアミド  
CDI : カルボニルジイミダゾール  
TFA : トリフルオロ酢酸  
TFMSA : トリフルオロメタンスルホン酸

【0029】実施例1 化合物1の合成

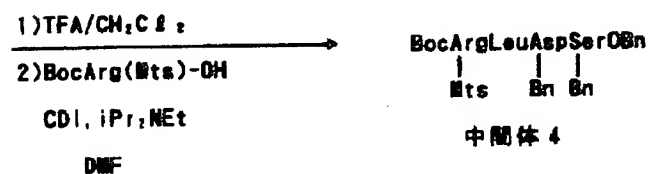
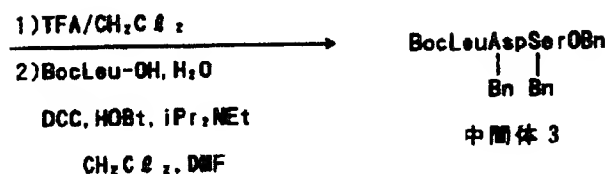
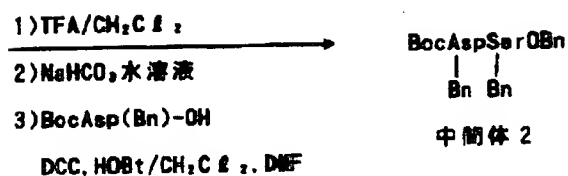
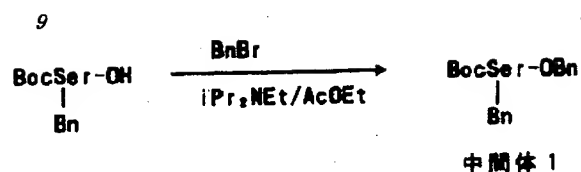
化合物1の液相法による合成法について詳細に説明する。化合物1の合成経路を以下に示す。

【0030】

【化4】

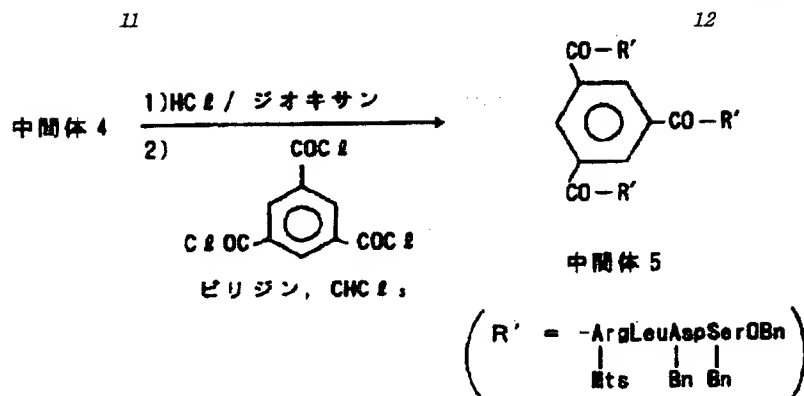
(6)

特開平6-239885



【0031】

【化5】



TFMSA/TFA

m-クレゾール, チオアニソール

化合物1

【0032】1) 中間体1の合成  
Boc-Ser(Bn)-OH (20.4 g, 69 mmol)、ベンジルプロミド (13 g, 76 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (9.8 g, 76 mmol) を酢酸エチル (100 ml) に溶解し、反応混合物を5時間加熱還流した。室温まで放冷した後生成した塩を濾過して除き、濾液を水、1 M クエン酸溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮して中間体1を無色油状物として得た。このものは精製することなく次の反応に用いた。

【0033】2) 中間体2の合成  
前項記載の方法により得た中間体1の塩化メチレン (80 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (80 ml) を加え、反応混合物を室温で40分間攪拌した。反応終了後減圧濃縮して大部分の溶媒を留去し、残渣を酢酸エチルで希釈し、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮してアミン体を無色油状物として得た。得られたアミン体と、Boc-Asp(Bn)-OH (22.6 g, 70 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (10.7 g, 70 mmol) をDMF (80 ml) 及び塩化メチレン (80 ml) の混合溶媒に溶解し、氷冷しながらDCC (14.4 g, 70 mmol) を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、セライト濾過して生成した沈殿を除去した。濾液を適量の酢酸エチルで希釈し、水、5% 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮して油状物を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製 (溶出液: ヘキサン/酢酸エチル = 4/1) し、目的とする中間体2を無色結晶として35.8 g (3段階で収率87%) 得た。

【0034】3) 中間体3の合成

中間体2 (35.7 g, 60.5 mmol) の塩化メチレン (100 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (100 ml) を加え、反応混合物を室温で40分間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩32.5 gを得た。得られたトリフルオロ酢酸塩 (22.7 g, 37.6 mmol) と、Boc-Leu-OH・1水和物 (9.34 g, 37.6 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール1水和物 (5.76 g, 37.6 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (5.2 g, 40 mmol) をDMF (40 ml) 及び塩化メチレン (40 ml) の混合溶媒に溶解し、氷冷しながらDCC (7.76 g, 37.6 mmol) を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜攪拌した後、セライト濾過して生成した沈殿を除去した。濾液を適量の酢酸エチルで希釈し、水、5% 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮して無色固形物を得た。このものをヘキサン/酢酸エチル (2/1) から再結晶して中間体3を22.1 g (84%) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 704.

【0035】4) 中間体4の合成

中間体3 (21.0 g, 30 mmol) の塩化メチレン (60 ml) 溶液にトリフルオロ酢酸 (60 ml) を加え、反応混合物を室温で1時間攪拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させてトリフルオロ酢酸塩20.8 gを得た。一方Boc-Arg(Mts)-OH (6.7 g, 15 mmol) をDMF (20 ml) に溶解し、このものに氷冷しながらCDI (2.4 g, 15 mmol) のDMF (15 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷しながら1時間攪拌したのち、上記操作により得られたトリフルオロ酢酸塩 (10.6 g, 15 mmol) とジイソプロピルエチルアミン (2.0 g, 15.5 mmol) のDMF



(30 ml) 溶液を加えた。反応混合物を氷冷下2時間、更に室温まで昇温しながら終夜撹拌した後、減圧下大部分の溶媒を留去した。残渣を氷水にあげて粗結晶を析出させた。得られた粗結晶を濾過して集め、水洗のち風乾して目的とする中間体4を無色結晶として14.4 g (92 %) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1042.

【0036】5) 中間体5の合成

中間体4 (10 g, 9.6 mmol) のジオキサン (70 ml) 溶液に塩化水素/ジオキサン溶液 (4 M, 60 ml) を加え、反応混合物を室温で2時間撹拌した。反応終了後溶媒を留去し、残渣をエーテルから結晶化させて塩酸塩9.3 g を得た。得られた塩酸塩 (2.09 g, 2.2 mmol) をピリジン (2 ml) 及びクロロホルム (15 ml) からなる混合溶媒に溶解し、このものにトリメチン酸クロライド (190 mg, 0.72 mmol) のクロロホルム (2 ml) 溶液を加えた。反応混合物を室温に終夜放置したのち減圧下溶媒を留去した。残渣を適当量のクロロホルムで希釈し、水、5 % 炭酸ナトリウム溶液、1 M クエン酸溶液、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸ナトリウムで乾燥のち減圧濃縮した。残渣をエーテルから結晶化させて、目的とする中間体5を2.1 g (定量的) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 2980.

【0037】6) 化合物1の合成

中間体5 (1.9 g, 0.68 mmol) のトリフルオロ酢酸 (15 ml) 溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸 (6 g)、チオアニソール (4 ml)、*m*-クレゾール (3.5 ml)、トリフルオロ酢酸 (18 ml) からなる混合溶液を氷冷しながら加え、反応混合物を氷冷下2時間撹拌した。反応液をエーテル (700 ml) に滴下して30分間ゆっくり撹拌した。沈殿した粗生成物を少量の水にとかし、イオン交換クロマトグラフィー (アンバーライトIRA-400、対イオンCl<sup>-</sup>) にかけて精製、凍結乾燥して目的とする化合物1を無色粉末として870 mg (88 %) 得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1624.

表1

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	154±35	(116-206)
Arg-Gly-Asp-Ser	160±48	(94-239)
Arg-Leu-Asp-Ser	116±39	(66-184)
化合物1	44±23	(21-75) *
化合物2	1±1	(0-1) *
化合物3	1±1	(0-1) *

\* t-検定で未処理区と比較して P<0.001

【0042】この結果によれば、従来から知られている y-Asp-Serは、マウス1匹あたり1000 μgの投与量では  
50 転移抑制効果を示さず、またArg-Leu-Asp-Serペプチド

\* 【0038】実施例2 化合物2の合成

実施例1に記載した中間体4のN末端側に、Boc-Asp(Bn)-OHをCDI法により縮合し、BocAsp(Bn)-Arg(Mts)-Leu-Asp(Bn)-Ser(Bn)-OBnを合成した。以下実施例1に記載の方法に従い、N末端のBoc基を除去したのちトリメチン酸クロライドと反応した。すべての保護基をトリフルオロメタンスルホン酸、チオアニソール、*m*-クレゾール/トリフルオロ酢酸混合系処理により除去し、イオン交換クロマトグラフィーにより精製、凍結乾燥して目的とする化合物2を無色粉末として得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1969.

【0039】実施例3 化合物3の合成

実施例1に記載の中間体3の合成において、Boc-Leu-OH・1水和物の代りにBoc-D-Leu-OH・1水和物を用いて同様に縮合反応を行い、Boc-D-Leu-Asp(Bn)-Ser(Bn)-OBnを合成した。以下実施例1及び2に記載の方法と同様に合成を行い、目的とする化合物3を無色粉末として得た。

FAB-MS: (M+H)<sup>+</sup> 1969.

20 【0040】実施例4 メラノーマ細胞を用いた実験的肺転移モデル系によるガン転移阻害作用に関する検討  
本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制作用について、実験的肺転移モデル系によって検討した。実施例に記載した本発明の化合物1~3、比較例としてテトラペプチドであるArg-Leu-Asp-Ser、及びフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serを用いた。これらのペプチド各々1000 μgと非常に転移性の強いガン細胞であるB16-BL6メラノーマ細胞 (対数増殖期のもの5 x 10<sup>4</sup> 個) を各々PBS中で混合し、これを1群5匹のC57BL/6の雄マウスに尾静脈注射により投与した。投与後14日目にマウスを屠殺、解剖し、肺に転移したガンのコロニー数を計測して対照のPBS投与群と比較した。その結果を以下の表1に示す。

【0041】

【表1】

\*

に関しては転移数の減少は見られたものの、未処理区と比較して有意差は認められなかった（危険率 5 %）。これに対し本発明の化合物 1 から 3 を投与した場合には、肺へのガン転移は顕著に抑制された。これは本発明の重要な目的の 1 つである、修飾による活性の増強が目論見通り達成されていることを示している。

【0043】実施例 5 メラノーマ細胞を用いた自然肺転移モデル系によるガン転移阻害作用の検討  
本発明の化合物のガン転移抑制作用について、より現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験により検討した。本発明の化合物 1～3 と、比較化合物としてテトラペプチドである Arg-Leu-Asp-Ser、及びフィブロネ \*

表 2

投与化合物	肺への転移数	
	平均±SD	(範囲)
PBS (未処理)	61±22	(25-103)
Arg-Gly-Asp-Ser	67±13	(53-88)
Arg-Leu-Asp-Ser	55±18	(35-94)
化合物 1	26±13	(11-52) *
化合物 2	24±15	(0-51) *
化合物 3	23±19	(0-61) *

\* t-検定で未処理区と比較して P<0.01

【0045】この結果によれば、本発明の化合物 1～3 の投与によって、現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験においてもガンの転移数は有意に抑制された。これに対して Arg-Gly-Asp-Ser や Arg-Leu-Asp-Ser には、自然肺転移モデル系におけるガン転移の抑制効果はなかった。従って本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制効果、およびその有用性、優位性は明白である。

【0046】実施例 6 リンパ腫細胞を用いた実験的転移モデル系によるガン転移阻害作用に関する検討  
本発明のペプチド誘導体のガン転移抑制作用について、悪性リンパ腫細胞である L5178Y ML25 T-lymphoma を用いて実験的転移モデル系により検討した。実施例に記載し

表 3

投与化合物	肝臓の重量	
	平均±SD	脾臓の重量 平均±SD
PBS (未処理)	3.12±0.82	0.19±0.04
Arg-Gly-Asp-Ser	3.13±1.16	0.21±0.05
Arg-Leu-Asp-Ser	1.57±0.73 **	0.11±0.05 *
化合物 1	1.19±0.11 ***	0.10±0.01 ***
化合物 2	1.16±0.10 ***	0.11±0.02 ***
化合物 3	1.07±0.08 ***	0.10±0.01 ***
リンパ腫細胞未投与	1.11±0.15	0.09±0.01

\* クチンの接着コア配列ペプチドである Arg-Gly-Asp-Ser を用いた。1 群 7 匹の C57BL/6 の雌マウスを用い、これらの右足かかと部分に B16-BL6 メラノーマ細胞（対数増殖期のも 5 × 10<sup>4</sup>/50 μl）を移植した。移植後 14、16、18、20、22、24、26 日目に被試験化合物を尾静脈注射により投与した（1 回あたり 100 μg/200 μl PBS）。移植ガンは 21 日目に外科的に切除した。メラノーマ移植後 35 日目にマウスを屠殺、解剖し、肺に転移したガンのコロニー数を計測して対照の PBS 投与群と比較した。その結果を以下の表 2 に示す。

【0044】

【表 2】

た本発明の化合物 1～3 と、比較化合物としてテトラペプチドである Arg-Leu-Asp-Ser、及びフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドである Arg-Gly-Asp-Ser を用いた。これらのペプチド各々 1000 μg と L5178Y ML25 T-lymphoma 細胞（対数増殖期のも 4 × 10<sup>4</sup> 個）を各々 PBS 中で混合し、これを 1 群 5 匹の CDF1 (BALB/C × DBA/2) の雌マウスに尾静脈注射により投与した。投与後 14 日目にマウスを屠殺、解剖してマウスの肝臓及び脾臓の重量を測定し、対照の PBS 投与群と比較した。その結果を以下の表 3 に示す。

【0047】

【表 3】

\* t-検定で未処理区と比較して  $P<0.02$

\*\*  $P<0.01$

\*\*\*  $P<0.001$

【0048】この結果によれば、本発明の化合物1から3の投与によって、肝臓及び脾臓の重量はリンパ腫細胞未投与区のそれとほぼ同程度となった。すなわち本発明の化合物は、悪性リンパ腫細胞であるL5178Y ML25 T-lymphomaの肝臓や脾臓への転移に対しても抑制効果を示すことが明らかとなった。これに対し既存のフィブロネクチンの接着コア配列ペプチドであるArg-Gly-Asp-Serは、L5178Y ML25 T-lymphomaに対して転移抑制効果を示さなかった。

【0049】以上実施例により本発明を特定の例に関して説明したが、限定して解釈されるべきではない。本発

明の本質及び範囲から逸脱しない種々の変更や修正が可能であることは明らかである。そしてそのような発明は本発明に含まれると考える。

【0050】

【発明の効果】以上説明したように本発明のペプチド誘導体は細胞接着性蛋白質であるフィブロネクチンのコア配列と比較して細胞接着性が大きく、ガン転移抑制作用等の種々の生物活性を十分に保持し、毒性の問題もほとんど無い。またメラノーマ細胞のみならずリンパ腫細胞に対してもガン転移抑制効果を示し、さらにより現実的な病態治療モデルである自然肺転移抑制試験においてもガン転移抑制作用を示す。またその構造は単純であるため合成も容易であり、医薬として価値の高いものである。

フロントページの続き

(72)発明者 済木 育夫

北海道札幌市厚別区厚別北3条西5丁目12

- 6

(72)発明者 東 市郎

北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3-2